

Research paper:

Comparison of the Effects of Native and Commercial Probiotic on Gluten Degradation



Elahe Rostami¹ , Reza Heidari² , Mahdie Shirzad^{3,4} , Elahe Motevaseli⁵ , *Mohammad Ali Mazlumi¹ 

1. Department of Medical Biotechnology, School of Advanced Technologies in Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
2. Research Center for Cancer Screening and Epidemiology, AJA University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
3. Department of Microbial Biotechnology, School of Biology and Center of Excellence in Phylogeny of Living Organisms, University of Tehran, College of Science, Tehran, Iran.
4. Microbial Technology and Products Research Center, University of Tehran, Tehran, Iran.
5. Department of Molecular Medicine, School of Advanced Technologies in Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.



Citation Rostami E, Heidari R, Shirzad M, Motevaseli E, Mazlumi MA. Comparison of the Effects of Native and Commercial Probiotic on Gluten Degradation. Qom University of Medical Sciences Journal. 2021; 15(8):550-563. <http://dx.doi.org/10.32598/qums.15.8.2260.1>

 <http://dx.doi.org/10.32598/qums.15.8.2260.1>



Received: 31 Jan 2021
Accepted: 23 Oct 2021
Available Online: 01 Oct 2021

Keywords:
Probiotics, Glutens,
Celiac disease, Prolyl
oligopeptidases,
Aminopeptidase N

ABSTRACT

Background and Objectives The main treatment for celiac disease is a gluten-free diet. Gluten infection occurs in 55%-32% of these patients, which can cause symptoms in these patients. Many patients with celiac disease are dissatisfied with a gluten-free diet and are interested in a non-dietary alternative treatment.

Methods In this study, probiotic samples of local dairy (milk, yogurt, and cheese) from Iran were collected in sterile conditions and after enzymatic extraction using a lysis buffer and a sonication method for enzyme activity of prolyl endopeptidase and aminopeptidase N were evaluated.

Results The highest absorption rate for Z-Gly-Pro-4-nitroanilide substrate that performs the evaluation of prolyl endopeptidase enzyme, respectively, for strains C10-1 (*L. pentosus*), B6-1 (*L. fermentum*), C5-2 (*L. paracasei*), Y5 (*L. paracasei*) and C11-1 (*L. pentosus*) and in relation to Leu-p-NA which assesses aminopeptidase N The highest uptake was observed for strains K1 (*L. helveticus*), B8-2 (*L. plantarum*), Y5 (*L. paracasei*), P2-3 and P35 (*L. plantarum*), respectively. All of the above strains showed significantly different uptake than the negative control containing buffer and substrate ($P < 0.05$). Finally, the 16s rRNA sequence of the isolated strains was registered in NCBI database.

Conclusion The results of the present study showed that number of native Iranian probiotics have effective activity of prolyl endopeptidase and aminopeptidase N which can be used as a selective combination for gluten degradation and to help celiac patients.

* **Corresponding Author:**

Mohammad Ali Mazlumi

Address: Department of Medical Biotechnology, School of Advanced Technologies in Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Tel: +98 (21) 43052000-121

E-Mail: ma.mazlumi@gmail.com

مقاله پژوهشی:

مقایسه اثرات پروبیوتیک‌های بومی و تجاری بر تجزیه گلوتن

الهام رستمی^۱، رضا حیدری^۲، مهدیه شیرزاد^{۳*}، الهه متوسلی^۴، محمدعلی مظلومی^۵

۱. گروه زیست فناوری پزشکی، دانشکده فناوری‌های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.
۲. مرکز تحقیقات اپیدمیولوژی و پایش سرطان، دانشگاه علوم پزشکی ارتش، تهران، ایران.
۳. گروه زیست فناوری میکروبی، دانشکده زیست‌شناسی و مرکز تعالی در فیلوژنی موجودات زنده، دانشکده علوم دانشگاه تهران، تهران، ایران.
۴. مرکز تحقیقات فناوری و محصولات میکروبی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.
۵. گروه پزشکی مولکولی، دانشکده فناوری‌های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: درمان اصلی بیماری سلیاک رژیم غذایی فاقد گلوتن است. آلودگی به گلوتن در رژیم غذایی برای ۳۲-۵۵ درصد از این بیماران رخ می‌دهد که می‌تواند سبب بروز علائم در این بیماران شود. یکی از نوین‌ترین روش‌های درمان سلیاک استفاده از پروبیوتیک‌های تغییردهنده یا تجزیه‌کننده پلی‌پپتید گلوتن است.

روش بررسی: در این مطالعه، نمونه‌های پروبیوتیک موردنظر از لبنیات محلی (شیر، ماست، کشک، سرشیر و پنیر) و گیاهان دارویی (نعنا و پونه و ریحون) ایران در شرایط استریل جمع‌آوری شدند و سپس فعالیت آنزیم‌های پرولیل‌اندوپپتیداز و آمینوپپتیداز نوع N مورد ارزیابی قرار گرفتند.

یافته‌ها: بیشترین میزان جذب برای سوسترای Z-Gly-Pro-4-nitroanilide که ارزیابی آنزیم پرولیل‌اندوپپتیداز را انجام می‌دهد به ترتیب مربوط به سویه‌های Y5 (L.paracasei)، C5-2 (L.paracasei)، B6-1 (L. fermentum)، C1-10 (L.pentosus) و C11- (L.pentosus) 1 است. در رابطه با سوسترای Leu-p-NA که ارزیابی آمینوپپتیداز نوع N را انجام می‌دهد بیشترین میزان جذب به ترتیب مربوط به سویه‌های P2-3 (L.pentosus)، Y5 (L.paracasei)، B8-2 (L. plantarum)، K1 (L. helveticus) و P35 (L. plantarum) است. همه‌ی سویه‌های مذکور نسبت به کنترل منفی که حاوی بافر و سوستر بود جذب با اختلاف معنادار را نشان دادند ($P < 0.05$).

نتیجه‌گیری: نتایج مطالعه نشان داد که تعدادی از پروبیوتیک‌های بومی ایران دارای فعالیت مؤثر پرولیل‌اندوپپتیداز و آمینوپپتیداز نوع N هستند که می‌توانند به عنوان گزینه‌های انتخابی جهت تجزیه گلوتن و کمک به بیماران سلیاک مورد استفاده قرار گیرند.

تاریخ دریافت: ۱۲ بهمن ۱۳۹۹

تاریخ پذیرش: ۰۱ آبان ۱۴۰۰

تاریخ انتشار: ۰۹ مهر ۱۴۰۰

کلیدواژه‌ها:

بیماری سلیاک،
گلوتن، پروبیوتیک،
پرولیل‌اندوپپتیداز،
آمینوپپتیداز نوع N

مقدمه

گلوتن ترکیبی از دو گلیکوپروتئین پرولامین (در گندم به نام گلیادین) و گلوتلین (در گندم به نام گلوتنین) است. گلوتن در آندوسپرم دانه‌های غلات از جمله گندم، تریتیکاله، چاودار، جو دوسر و جو یافت می‌شود. مولکول‌های غیرقابل تجزیه گلیادین از جمله α -گلیادین که نسبت به هضم توسط آنزیم‌های گوارشی مقاوم هستند، در مجرای گوارشی باقی می‌مانند و ایجاد سمیت می‌کنند. در صورتی که فرد مبتلا، پروتئینی از دسته گلوتن را مصرف کنند، دچار یک واکنش ایمنی می‌شود که منجر به آسیب‌های روده باریک و اختلال در جذب مواد غذایی می‌شود [۴، ۵]. علائم بالینی در نوزادان و کودکان کم‌سن‌وسال به صورت رشد ناکافی و اتساع

بیماری سلیاک^۱ یا اسپروی سلیاک یک انتروپاتی خودایمنی مزمن روده باریک با زمینه ژنتیکی است که مربوط به عدم تحمل گلوتن است [۱]. طبق مطالعات قبلی، این بیماری در بزرگسالان و کودکان با نرخ نزدیک به ۱ درصد بروز می‌کند و شیوع نسبتاً یکنواخت در بسیاری از کشورها جهان دارد [۲]. اولین توصیف دقیق از بیماری توسط ساموئل جی در سال ۱۸۸۸ انجام شد. او پیشنهاد کرد که رژیم درمانی ممکن است برای بهبود علائم بیماری مفید باشد [۳].

1. Coeliac disease

* نویسنده مسئول:

محمدعلی مظلومی

نشانی: تهران، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده فناوری‌های نوین پزشکی، گروه بیوتکنولوژی پزشکی.

تلفن: ۰۲۱-۴۳۰۵۲۰۰۰ (۲۱) ۹۸

رایانامه: ma.mazlomi@gmail.com

محدودیت‌های مطالعات انجام شده در ایران در رابطه با اثر پروبیوتیک بر تجزیه پلی‌پپتید گلوتن، طراحی مطالعه‌ای مبتنی بر بررسی اثرات پروبیوتیک‌های بومی ایران در تجزیه گلوتن (گیلیادین) ضروری به نظر می‌رسد.

روش بررسی

جمع آوری نمونه

نمونه‌های موردنظر از لبنیات محلی (شیر، ماست، پنیر، کشک، کره و سر شیر) و گیاهان دارویی ایران (نعنا و پونه و ریحون) در شرایط استریل جمع‌آوری شدند [۲۰]. نمونه‌ها از شهرهایی همچون اصفهان، اراک، یزد، زنجان، تالش، گلپایگان، فیروزکوه، شیراز، تبریز، طالقان و پلور در بین سال ۱۳۹۶ تا ۱۳۹۷ جمع‌آوری شدند. سپس نمونه‌ها در دمای ۴ درجه نگهداری شدند.

آماده‌سازی نمونه‌ها

یک گرم از نمونه‌های گیاهی ابتدا با تیغ استریل خرد شدند و نمونه‌های لبنی تنها با ورتکس به مدت یک دقیقه در ۱۰ میلی‌لیتر محیط MRS broth هموژن شدند. سپس نمونه‌ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه در شرایط بی‌هوازی انکوبه شدند. بعد از انکوباسیون، برای به دست آوردن تک‌کلنی از هریک از محیط‌های ذکرشده، ۰/۳ میلی‌لیتر سوسپانسیون به پلیت‌های MRS agar منتقل و به صورت چمنی کشت داده شدند. سپس نمونه‌ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در شرایط بی‌هوازی انکوبه شدند.

رنگ‌آمیزی و تست بیوشیمیایی

بعد از انکوباسیون، از هریک از کلنی‌های به دست آمده رنگ‌آمیزی گرم و تست کاتالاز به عمل آمد. پس از اطمینان از وجود باکتری‌های میل‌های، کوکو باسیل تا کوکسی، گرم مثبت و کاتالاز منفی، از هر کدام کشت خالص تهیه شد و برای انجام آزمایش‌های بعدی در محیط MRS broth حاوی ۲۰ درصد گلیسرول، در دمای منفی ۲۰ درجه نگهداری شد.

جداسازی پروبیوتیک و تهیه بیومس

به ۱۰ میلی‌لیتر از محیط کشت MRS Broth، ۱ درصد از سوسپانسیون سویه‌های جداسازی شده از لبنیات تلقیح شد و برای ۲۴ ساعت در شرایط بی‌هوازی و در دمای ۳۵ درجه انکوبه شد. بعد از انکوباسیون، بیومس باکتری به وسیله سانتریفیوژ به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه و دور ۵۰۰۰ g جدا سازی شد. سپس آنزیم‌ها از بیومس جداسازی شدند.

شکمی است. کودکان با سن بیشتر و نوجوانان علائم خارج رودهای و علائم نورولوژیک و آنمی را بروز می‌دهند [۶].

درمان اصلی بیماری سلیاک رژیم غذایی فاقد گلوتن است [۷] و بهبودی و رفع علائم بیماری طی چند روز تا چند هفته رخ می‌دهد. با وجود اثربخشی این رژیم غذایی، به دلیل هزینه‌بر بودن، آلودگی‌های احتمالی به گلوتن و عدم امکان دسترسی مداوم به مواد غذایی بدون گلوتن، بیماران به یک درمان غیررژیمی علاقه بیشتری نشان می‌دهند [۸]. پیشرفت‌های جدید در پاتوفیزیولوژی سلیاک سبب ارائه درمان‌هایی نوینی از قبیل گلوتن‌های تغییر یافته ژنتیکی، مهارکننده zonulin، واکسن درمانی (Nexvax2) و مهارکننده ترنس گلوتامیناز بافتی شده است [۹].

یکی از جدیدترین این درمان‌ها، استفاده از پروبیوتیک‌هاست. منبع باکتری‌های پروبیوتیک، لبنیات و میوه‌ها هستند [۱۰]. مهم‌ترین میکروارگانیسم‌هایی که در منابع گوناگون تحت عنوان پروبیوتیک از آن‌ها یاد می‌شود را می‌توان در ۴ دسته جنس لاکتوباسیل، جنس غیر لاکتوباسیل، جنس بیفیدوباکتریوم و سایر پروبیوتیک‌ها خلاصه کرد. مهم‌ترین و مرسوم‌ترین پروبیوتیک‌ها به جنس‌های لاکتوباسیلوس و بیفیدوباکتریوم تعلق دارند [۱۱]. مطابق مطالعات انجام شده پروبیوتیک‌ها با پیشگیری از اسهال، متعادل کردن میکروفلور روده، تعدیل ایمنی، کاهش کلسترول، بهبود تحمل لاکتوز و پیشگیری از سرطان، کاهش فشار خون، کاهش التهاب و کاهش نشانه‌های آلرژیک نقش درمانی مؤثری را ایفا می‌کنند [۱۲]. همچنین پروبیوتیک‌ها می‌توانند سبب بهبود بیماری‌های خودایمنی همچون میاستنی گراویس و اسکیزوفرنی شوند [۱۳، ۱۴].

بررسی‌ها در خصوص پروبیوتیک‌ها نشان می‌دهد که این‌ها قادر به تولید آنزیم‌های تجزیه‌کننده گلیادین هستند که منجر به بهبود علائم بیماری می‌شود [۱۵]. در بررسی‌ها نشان داده شده که تعدادی از باکتری‌ها متعلق به گونه لاکتوباسیل و بیفیدوباکتریوم که دارای آنزیم‌های تجزیه‌کننده گلوتن هستند، سبب حفاظت سلول‌های اپی‌تلیال در برابر اثرات سمی گلیادین می‌شوند [۹]. نمونه تجاری VSL#3 که ترکیبی از ۸ گونه پروبیوتیک (Bifido bacterium breve, B. longum, B. infantis, Lactobacillus plantarum, L. acidophilus, L. casei, L. delbrueckii subsp. bulgaricus, and Streptococcus thermophiles) است در تجزیه پلی‌پپتیدهای گلیادین کارآمد عمل می‌کند. فعالیت آنزیم‌های تجزیه‌کننده پپتیدهای غنی از پرولین و آمینوپپتیدازهایی که تنظیم‌کننده تجزیه اپیتوپ‌های گلیادین است به طور وسیعی در VSL#3 موجود است [۱۶].

با توجه به شیوع رو به افزایش بیماری سلیاک در جهان [۱۷] و ایران [۱۸] و نیز با توجه به عوارض جسمی، روانی، اجتماعی و اقتصادی حاصل از ابتلا به بیماری سلیاک [۱۹] و همچنین

جدول ۱. مشخصات پرایمرهای واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

نام پرایمر	توالی پرایمر (۵'→۳')	دمای ذوب پرایمر (Tm)
F27	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	۵۵/۴
R1492	CGGTTACCTTGTTACGACTT	۵۵/۴


 مجله
دانشگاه علوم پزشکی قم

استخراج آنزیم

شناسایی ملکولی سویه‌های انتخاب‌شده

استخراج DNA با استفاده از DNG PLUS Kit (سینا کلون) طبق دستورالعمل تولیدکننده انجام گرفت. شناسایی مولکولی توسط تعیین توالی ژن S rRNA16 انجام شد. هر ۲۵ میکرولیتر از ترکیب PCR حاوی ۱۲/۵ میکرولیتر Amplicon Master Mix، ۱ میکرولیتر Forward و Reverse، ۱ میکرولیتر از DNA الگو (۱۰۰ نانوگرم) و ۹/۵ میکرولیتر آب دیونیزه بود. PCR به ترتیب در ۳۲ سیکل انجام شد. دناتوراسیون اولیه (۹۵ درجه برای ۳ دقیقه)، دناتوراسیون (۹۵ درجه برای ۳۰ ثانیه)، اتصال (۵۶ درجه برای ۳۰ ثانیه)، تکثیر (۷۲ درجه برای ۱ دقیقه و ۳۰ ثانیه) و تکثیر نهایی (۷۲ درجه برای ۱۰ دقیقه). توالی پرایمر ژن S rRNA16 مورد استفاده برای انجام واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمرز و شناسایی مولکولی باکتری‌ها در جدول شماره ۱ آمده است.

آنالیز نتایج PCR

قطعات تکثیرشده از S rRNA16 (تقریباً ۱۵۰۰ جفت باز) در ژل آگارز ۱ درصد و بافر TBE در ۱۰۰ ولت برای ۳۰ دقیقه بررسی شد. رنگ‌آمیزی با استفاده از رنگ فلورسنت safe stain انجام شد و در نهایت برای مشاهده نتیجه، ژل زیر تابش نور UV در دستگاه ژل داک قرار گرفت (Gel DocTM XR, Bio- Rad, Laboratories, Hercules, CA). ساینز قطعات DNA با استفاده از لدر ۱۰۰۰ جفت باز (Sinaclon) مورد آنالیز قرار گرفتند.

توالی‌یابی و هم‌ترازی توالی

محصول PCR جهت توالی‌یابی به همراه پرایمرها به شرکت تکاپوزیست ارسال شد. توالی به‌دست‌آمده به کمک خوانش از هر دو طرف توالی‌یابی شد. در انتها نیز توالی موردنظر در پایگاه‌های داده^۲ ثبت شد و با دیگر توالی‌های موجود در این سایت‌ها هم‌ترازی شدند.

آنالیز آماری

داده‌های این پژوهش، به طور متوسط در ۳ آزمایش مستقل از هم انجام گرفت. میزان خطای هر آزمایش با استفاده از انحراف معیار محاسبه شد. تحلیل آماری داده‌ها، ابتدا به روش غیرپارامتری

بعد از آنکوایسیون، بیومس باکتری به وسیله سانتریفیوژ (۵۰۰g) جدا شد. سپس آنزیم‌ها از بیومس جداسازی شدند. برای این منظور بیومس باکتری دو بار با سرم فیزیولوژیک استریل شست‌وشو شدند و هر بار به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه و دور ۵۰۰g جدا شدند. سپس سلول‌ها با اضافه کردن ۵۰۰ μl بافر لیزکننده و ۵ μl تریتون به صورت سوسپانسیون درآمدند. بافر لیزکننده ترکیبی از Tris 50mM، EDTA 5 mM، NaCl 50mM بود. بعد از اضافه کردن بافر لیزکننده سلول‌ها در معرض سونیفیکاسیون (۲ دقیقه در دمای ۱۵ درجه، ۱۵ ثانیه پالس روشن و ۱۵ ثانیه پالس خاموش سونیکاتور) قرار گرفتند. در مرحله بعد برای حذف سلول‌های آسیب‌دیده، سانتریفیوژ به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه و دور ۵۰۰g انجام گرفت. سوپرناتانت حاوی آنزیم‌ها برای آنالیزهای بعدی مورد استفاده قرار گرفت.

غربالگری گونه‌های تولیدکننده آنزیم‌های پروتئولیتیک

سوبسترای کروموزنیک (Sigma، Z-Gly-Pro-4-nitroanilide (St. Louis USA) برای غربالگری گونه‌ها از نظر تولید آنزیم‌های آمینوپپتیداز نوع N (PepN) و (San-) (pNA) Leu-p-nitro-anilin (Cruz Biotechnology, Inc) ta برای غربالگری گونه‌ها از نظر تولید پرولیل‌اندوپپتیداز (PEP) مورد استفاده قرار گرفت. سوبستراهای فوق دارای p-nitro-anilin (pNA) هستند که در صورت وجود آنزیم پروتئولیتیک در نمونه برش خورده و آزاد می‌شوند. رهایی آن‌ها را می‌توان با اندازه‌گیری جذب با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۱۰ nm بررسی کرد. فعالیت پروتئولیتیک بدین صورت مورد ارزیابی قرار گرفت که ۱۰۰ μl از محلول حاوی آنزیم که در بالا آماده‌سازی آن توضیح داده شد در ۲ml بافر پتاسیم فسفات حل شد و ۵۰ μl سوبسترای کروموزنیک که در متانول حل شده بود، به آن اضافه شد. ترکیب واکنش برای ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه تحت لرزش مداوم انکوبه شد. آزادسازی ملکول pNA با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۱۰ nm اندازه‌گیری شد. ۵ نمونه از گونه‌هایی که بیشترین جذب را داشتند تعیین سویه شدند که می‌توانند به عنوان گونه‌های دارای توانایی بالقوه جهت بهبود بیماران سلیاکی در نظر گرفته شوند.

2. NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>); EZTaxon (<http://eztaxon-eztaxon.ezbiocloud.net/identify>)

جدول ۲. مشخصات جدایه‌ها و میزان جذب در ۴۱۰ نانومتر با دو سوبسترای (S1) Leu-p-NA و (S2) Z-Gly-Pro-4-nitroanilid

منبع جداسازی	سویه	مشاهده میکروسکوپی	میانگین $\pm$ انحراف معیار	
			میزان جذب (S1)	میزان جذب (S2)
پنیر (تبریز)	C1-1	باسیل کوتاه گرم مثبت	0.23 ± 0.03	0.93 ± 0.01
	C1-2	باسیل متوسط گرم مثبت	0.25 ± 0.04	0.275 ± 0.03
	C1-3	باسیل متوسط خمیده گرم مثبت	0.2 ± 0.02	0.198 ± 0.05
پنیرپودری (پلور)	C3-1	باسیل متوسط گرم مثبت	0.28 ± 0.04	0.18 ± 0.02
	C3-3	باسیل متوسط گرم مثبت	0.39 ± 0.05	0.31 ± 0.01
پنیر روستایی (طالقان)	C5-1	باسیل کوتاه گرم مثبت	0.305 ± 0.03	0.125 ± 0.04
	C5-2	باسیل متوسط کمی خمیده گرم مثبت	0.58 ± 0.05	0.33 ± 0.02
	C5-3	باسیل متوسط گرم مثبت	0.37 ± 0.06	0.143 ± 0.03
	C5-4	کوکوباسیل گرم مثبت	0.2 ± 0.02	0.102 ± 0.03
پنیر محلی (تبریز)	C 6-2	باسیل متوسط گرم مثبت	0.385 ± 0.04	0.39 ± 0.04
	C 6-3	باسیل کوتاه گرم مثبت	0.34 ± 0.03	0.283 ± 0.05
پنیر محلی (اصفهان)	C7-1	باسیل کوتاه گرم مثبت	0.29 ± 0.02	$0.1 \pm 0.026 \pm$
پنیر محلی (شیراز)	C8-1	باسیل کوتاه گرم مثبت	0.337 ± 0.05	$0.2 \pm 0.129 \pm$
پنیر محلی (اراک)	C10-1	باسیل کوتاه گرم مثبت	0.7 ± 0.04	0.135 ± 0.04
	C10-2	باسیل بلند طنابی گرم مثبت	0.393 ± 0.02	0.31 ± 0.03
پنیر (تالش)	C11-1	باسیل متوسط گرم مثبت	0.4 ± 0.02	0.076 ± 0.01
	C11-2	باسیل متوسط گرم مثبت	0.308 ± 0.03	0.145 ± 0.02
کره محلی (اراک)	B1-1	باسیل بلند طنابی گرم مثبت	0.315 ± 0.05	0.05 ± 0.03
	B1-2	باسیل کوتاه گرم مثبت	0.285 ± 0.04	0.124 ± 0.04
کره محلی (تبریز)	B2-1	باسیل بلند طنابی گرم مثبت	0.195 ± 0.01	0.2 ± 0.01
	B2-2	باسیل بلند طنابی گرم مثبت	0.345 ± 0.02	0.05 ± 0.02
	B2-3	باسیل کوتاه گرم مثبت	$0.3 \pm 0.28 \pm$	0.04 ± 0.01
کره محلی (اصفهان)	B4-1	باسیل کوتاه گرم مثبت	0.22 ± 0.01	0.062 ± 0.03
	B4-2	باسیل بلند طنابی گرم مثبت	0.333 ± 0.04	0.05 ± 0.02
	B4-3	کوکوباسیل گرم مثبت	0.205 ± 0.03	0.049 ± 0.03
کره محلی (شیراز)	B6-1	باسیل کوتاه گرم مثبت	0.65 ± 0.03	0.035 ± 0.02
سرشیر محلی (اراک)	B8-1	باسیل متوسط گرم مثبت	0.29 ± 0.02	0.16 ± 0.03
	B8-2	باسیل کوتاه گرم مثبت (به شدت کش‌دار)	0.2 ± 0.02	0.529 ± 0.04
کره محلی (خراسان شمالی)	B9-1	باسیل کوتاه گرم مثبت	0.326 ± 0.04	0.205 ± 0.02
ماست گاوی (گلپایگان)	Y1	باسیل طنابی گرم مثبت	0.38 ± 0.03	0.15 ± 0.02
پنیر پودری از دوغ کره (تالش)	Y3-2	باسیل کوتاه گرم مثبت	0.37 ± 0.01	0.067 ± 0.01
	Y3-4	باسیل متوسط گرم مثبت	0.29 ± 0.03	0.0685 ± 0.01
	Y3-6	باسیل متوسط گرم مثبت زنجیر هوار	0.15 ± 0.01	0.34 ± 0.03
ماست (زنجان)	Y4-1	باسیل کوتاه گرم مثبت	0.39 ± 0.05	0.11 ± 0.01

منبع جداسازی	سویه	مشاهده میکروسکوپی	میانگین $\pm$ انحراف معیار	میزان جذب (S1)	میزان جذب (S2)
ماست چکیده (نام آور فیروزکوه)	Y5	باسیل کوتاه گرم مثبت		0.55 ± 0.03	0.518 ± 0.02
ماست (اصفهان)	Y6-1	باسیل بلند رشته‌ای گرم مثبت		0.25 ± 0.02	0.076 ± 0.01
	Y6-2	باسیل بلند رشته‌ای گرم مثبت		0.18 ± 0.01	0.139 ± 0.02
	Y6-3	باسیل کوتاه گرم مثبت		0.11 ± 0.01	0.039 ± 0.01
ماست محلی (اراک)	Y7-1	باسیل بلند طنابی گرم مثبت		0.15 ± 0.02	0.173 ± 0.03
	Y7-2	باسیل کوتاه گرم مثبت		0.2 ± 0.03	0.105 ± 0.02
ماست محلی (اصفهان)	Y8-1	باسیل ضخیم بلند طنابی گرم مثبت		0.285 ± 0.04	0.09 ± 0.01
	Y8-2	باسیل کوتاه گرم مثبت		0.333 ± 0.03	0.085 ± 0.02
ماست محلی (یزد)	Y9-1	باسیل بلند طنابی گرم مثبت		0.145 ± 0.01	0.087 ± 0.02
کشت محلی (اصفهان)	K1	باسیل بلند گرم مثبت زنجیر کوتاه		0.3 ± 0.03	0.586 ± 0.04
ریحان	P1-1	باسیل کوتاه گرم مثبت		0.18 ± 0.01	0.155 ± 0.02
	P1-2	باسیل متوسط گرم مثبت		0.195 ± 0.02	0.098 ± 0.01
پونه	P2-1	باسیل کوتاه گرم مثبت		0.265 ± 0.03	0.045 ± 0.02
	P2-2	باسیل کوتاه گرم مثبت		0.3 ± 0.04	0.156 ± 0.03
	P2-3	باسیل کوتاه گرم مثبت		0.156 ± 0.02	0.485 ± 0.03
	P35	باسیل متوسط گرم مثبت		0.24 ± 0.03	0.355 ± 0.04

بافر و سوپسترا بود جذب را با اختلاف معناداری را نشان دادند ($P < 0.05$). در ۱۰ سویه، میزان جذب از کنترل مثبت، مقادیر بالاتری را نشان می‌دهد که البته این اختلاف معنادار نیست که بتوان ادعا کرد در سویه‌های بومی فعالیت بالاتری مشاهده می‌شود، اما فعالیت در سطح VSL#3 را می‌توان برای سویه‌های بومی مطرح کرد. در رابطه با سوپسترای Leu-p-NA که ارزیابی آمینوپپتیداز نوع N را انجام می‌دهد، بیشترین میزان جذب به ترتیب مربوط به سویه‌های P2-3، Y5، B8-2، K1 و P35 است. سویه Y5 برای هر دو آنزیم دارای فعالیت است. در مقایسه با فعالیت آنزیمی پرولیل اندوپپتیداز، همه سویه‌های پروبیوتیک بومی برای آنزیم آمینوپپتیداز نوع N دارای فعالیت نیستند و اختلاف معناداری نسبت به کنترل منفی نشان ندادند. البته ۸ سویه جذب بیشتری نسبت به VSL#3 که به عنوان سویه کنترل مثبت مورد ارزیابی قرار گرفت، نشان دادند و سایر سویه‌ها فاقد چنین فعالیتی بودند. در این مورد هم اختلاف میزان جذب برای سویه‌های مثبت نسبت به VSL#3 معنادار نبوده و تنها می‌توان ادعا کرد که سویه‌های فوق دارای فعالیت هم‌سطح با نمونه تجاری هستند. ۵ سویه که دارای بیشترین میزان جذب برای دو سوپسترای مذکور بودند، به عنوان سویه‌های برتر شناسایی مولکولی شدند تا جنس و گونه آن‌ها مشخص شود. **تصویرهای شماره ۱ و ۲**، به ترتیب ۵ سویه مثبت برای آنزیم

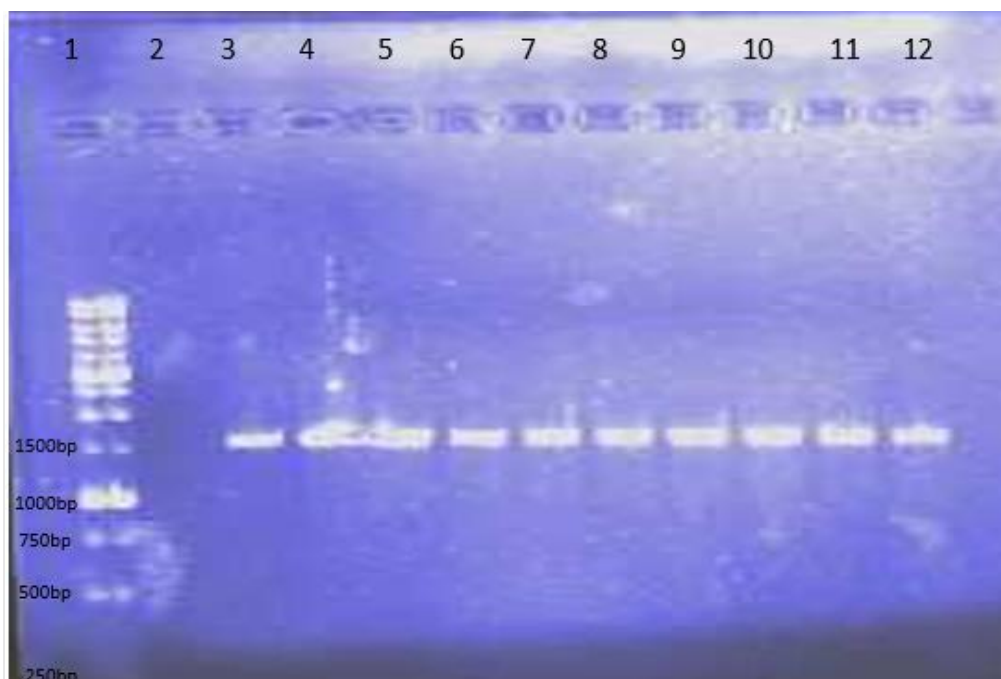
انجام گرفت و سپس با استفاده از آزمون من‌ویتنی محاسبه شد. تفاوت معنی‌دار در محاسبات، P کمتر از ۰/۵۰ در نظر گرفته شد. آنالیز آماری این مطالعه عمدتاً با استفاده از نرم‌افزارهای آماری SPSS نسخه ۲۲ انجام گرفت.

یافته‌ها

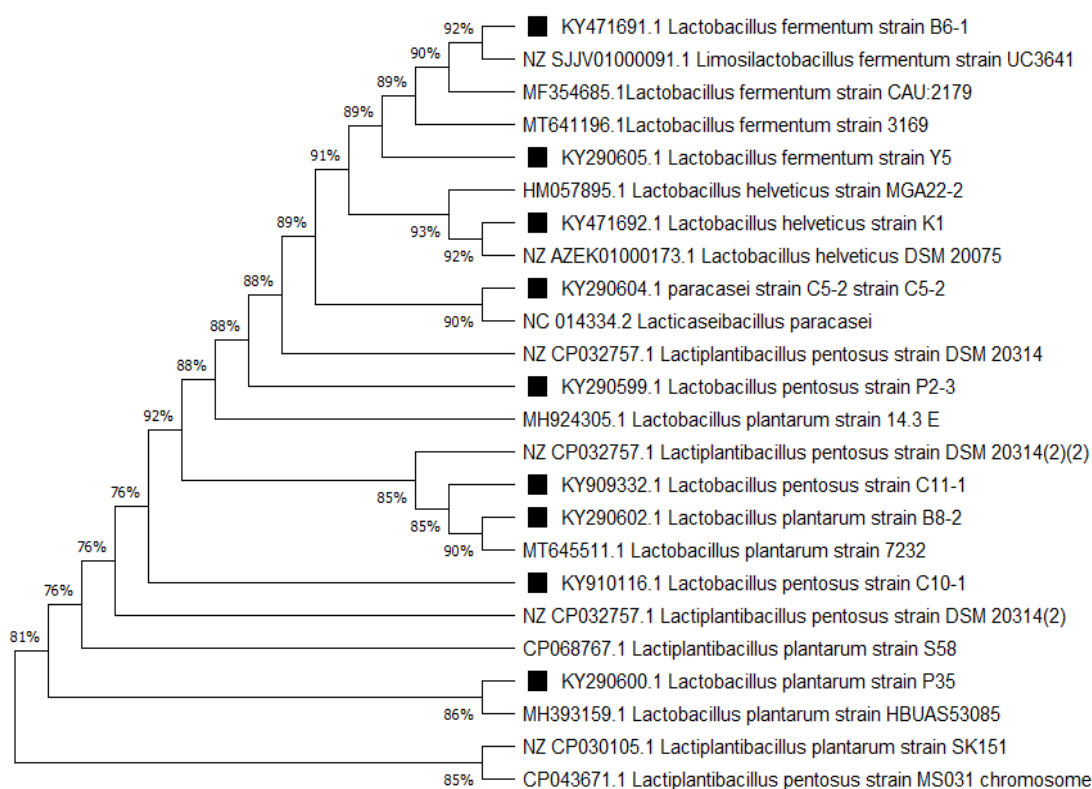
غربالگری گونه‌های تولیدکننده آنزیم‌های پروتئولیتیک

از میان نمونه‌های گیاهی و لبنی جداسازی شده ۵۰ نمونه باسیل گرم مثبت و کاتالاز منفی جداسازی شد. **جدول شماره ۲** مشخصات سویه‌ها، منبع جداسازی آن‌ها و میزان جذب در ۴۱۰ نانومتر را نشان می‌دهد. تمام داده‌های ارائه شده میانگین $\pm$ انحراف معیار هستند.

نتایج غربالگری (**جدول شماره ۲**) برای سوپسترای Z-Gly-Pro-4nitroanilid (S1) که ارزیابی آنزیم پرولیل اندوپپتیداز را انجام می‌دهد به ترتیب بیشترین میزان جذب سویه‌های C1-10، Y5، C5-2، B6-1 و C11-1 به خود اختصاص می‌دهند. مقایسه میزان جذب ۵۰ سویه پروبیوتیک بومی با VSL#3 که به عنوان سویه کنترل مثبت مورد ارزیابی قرار گرفت، نشان می‌دهد که فعالیت آنزیم پرولیل اندوپپتیداز به طور عمومی در همه سویه‌ها مشاهده می‌شود. همه سویه‌ها نسبت به کنترل منفی که حاوی

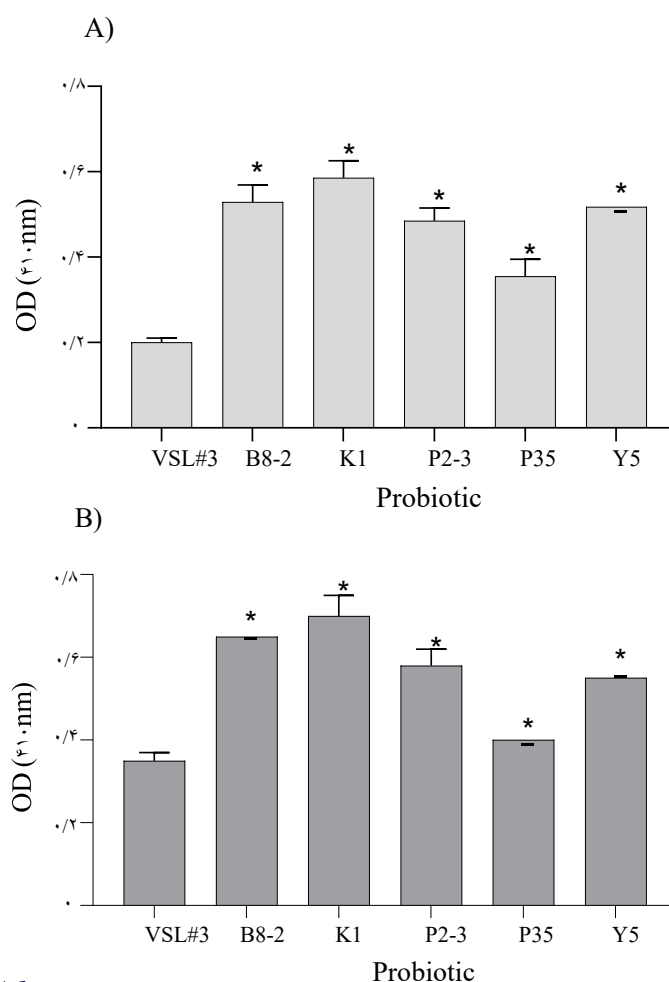


تصویر ۱. تصویر ژل الکتروفورز از محصول PCR ژنهای ۱۶ s rRNA
ستون ۱: DNA marker، ستون ۲: کنترل منفی (PCR (No template)، ستون ۳: سویه‌های مثبت جدا شده از محصولات لبی و گیاهان دارویی، ستون ۱۲: *L.plantarum* به عنوان کنترل مثبت.



جدول ۳. سویه‌های انتخاب‌شده در این پژوهش

شماره	شناسه نمونه	سویه	کد ثبت‌شده در بانک ژنی
۱	C5-2	<i>L. paracasei</i>	KY290604.1
۲	B6-1	<i>L. fermentum</i>	KY471691.1
۳	B8-2	<i>L. plantarum</i>	KY290602.1
۴	C10-1	<i>L. pentosus</i>	KY910116.1
۵	C11-1	<i>L. pentosus</i>	KY909332.1
۶	K1	<i>L. helveticus</i>	KY471692.1
۷	P2-3	<i>L. pentosus</i>	KY290599.1
۸	P35	<i>L. plantarum</i>	KY290600.1
۹	Y5	<i>L. paracasei</i>	KY290605.1


 مجله
دانشگاه علوم پزشکی قم


 مجله
دانشگاه علوم پزشکی قم

تصویر ۳. میزان جذب نمونه‌های پروبیوتیک‌های بومی در مقایسه با نمونه تجاری VSL#3 در مواجهه با سوبسترای کروموژنتیک ۴-Z-Gly-Pro nitroanilid به منظور ارزیابی آنزیم پرولیل اندوپپتیداز. میزان جذب نمونه‌های پروبیوتیک‌های بومی با VSL#3 در مواجهه با سوبسترای Leu-p-NA به منظور ارزیابی آنزیم پرولیل اندوپپتیداز آمینوپپتیداز نوع N. علامت * نشان‌دهنده وجود اختلاف معنادار است ($P < 0.05$).

جدول ۴. مشخصات پروبیوتیک‌های تجاری و میزان جذب در ۴۱۰ نانومتر با دو سوبسترای (S1) 4 Pro-nitroanilid و (S2) Leu-p-NA

میانگین $\pm$ انحراف معیار		ترکیب	نام پروبیوتیک
میزان جذب (S2)	میزان جذب (S1)		
0.200 ± 0.01	0.250 ± 0.02	Bifidobacterium breve، B. longum، B. infantis، Lactobacillus plantarum، L. acidophilus، L. casei، L. delbrueckii subsp. Bulgaricus و Streptococcus thermophiles	VSL#3
0.042 ± 0.01	0.230 ± 0.03	Lactobacillus acidophilus، L. plantarum، L. helveticus، L. paracasei، L. casei، L. brevis، L. rhamnosus، L. bulgaricus، L. gasseri، L. salivarius، Bifidobacterium lactis، B. longum 175، B. bifidum، B. breve، B. infantis و B. longum	Mood+ (Dr. Formulated Probiotics)
0.059 ± 0.01	0.125 ± 0.02	L. acidophilus، L. gasseri، L. paracasei، L. plantarum، L. casei، L. brevis، L. rhamnosus، L. salivarius، L. bulgaricus، B. lactis، B. breve، B. infantis، B. bifidum و B. longum	Organic Kids+ (Dr. Formulated Probiotics)

بحث

لاکتوباسیل‌ها از مهم‌ترین گروه باکتری‌های اسیدلاکتیک هستند که نقش سلامت‌بخشی آن‌ها به اثبات رسیده است [۲۱]. این باکتری‌ها به دلیل GRAS بودن، اهمیت زیادی برای استفاده در بیوتکنولوژی غذایی و دارویی دارند. نتایج تحقیقات بیانگر آن‌اند که پروبیوتیک‌ها در درمان بیماری‌های خودایمنی از جمله مولتیپل اسکلروزیس، دیابت نوع ۱ و آرتریت روماتوئید نقش مؤثری دارند [۲]. همچنین اثربخشی پروبیوتیک‌ها در درمان و پیشگیری سلیاک در مطالعات مختلف مورد ارزیابی قرار گرفته است. در بررسی‌ها نشان داده شده که تعدادی از باکتری‌ها متعلق به گونه لاکتوباسیل و بیفیدوباکتریوم سبب حفاظت سلول‌های اپی‌تلیال در برابر گلوتن می‌شوند [۱۴]. در یک بررسی که در سال ۲۰۱۷ انجام گرفت ۱۸ گونه پروبیوتیک تجاری از لحاظ توانایی آنزیماتیک برای تجزیه گلوتن مورد ارزیابی قرار گرفتند. ۱۰ گونه لاکتوباسیل با بیشترین فعالیت آنزیمی در تجزیه اپیتوپ‌های غنی از پرولین انتخاب شدند. نتایج نشان داد که ترکیب این ۱۰ گونه لاکتوباسیل می‌تواند به عنوان یک فرمول پروبیوتیک بالقوه برای درمان بیماران سلیاک باشد [۲۲].

در یک بررسی که در سال ۲۰۱۷ انجام گرفت ۱۸ گونه پروبیوتیک تجاری از لحاظ فعالیت آمینوپپتیداز نوع N، ایمونوپپتیداز، پرولیل‌اندوپپتیداز، تری‌پپتیداز، پرولیداز، پرولیناز و دی‌پپتیداز بررسی شدند. لاکتوباسیلوس پلاتناروم LP27 و LP35، لاکتوباسیلوس بولگاریکوس SP5 و دلبروکی بیشترین فعالیت آمینوپپتیداز نوع N و لاکتوباسیلوس پاراکاژی GP12 و BGP2، لاکتوباسیلوس پلاتناروم LP33 و لاکتوباسیلوس رامنوسوس SP1 دارای بیشترین فعالیت پرولیل‌اندوپپتیداز بودند. ۱۰ گونه لاکتوباسیل با بیشترین فعالیت آنزیمی در تجزیه اپیتوپ‌های

پرولیل‌اندوپپتیداز و آمینوپپتیداز نوع N را در مقایسه با VSL#3 نشان می‌دهند.

شناسایی ملکولی سویه‌های انتخاب‌شده

تصویر شماره ۱ محصول PCR ژن rDNA s ۱۶ برای ۹ سویه لاکتوباسیل انتخاب‌شده (حدود ۱۵۰۰ bp) را نشان می‌دهد که ابتدا بر روی ژل آگارز ۱ درصد برده شد تا از کیفیت آن اطمینان حاصل شود.

جدول شماره ۳، جنس و گونه حاصل از Blast سویه‌های انتخاب‌شده در این پژوهش و نیز Accession number ثبت‌شده در NCBI را نشان می‌دهد. همچنین نتایج میزان شباهت بین سویه‌های جدا شده با سویه‌های موجود در درخت فیلوژنی در **تصویر شماره ۲** ارائه شده است. اعداد نوشته شده بروی خطوط بیانگر بوت استرپ است.

مقایسه نتایج عملکرد پروبیوتیک‌های بومی و تجاری

نتایج مطالعه نشان می‌دهد که پروبیوتیک‌های بومی از طریق تولید آنزیم‌های پرولیل‌اندوپپتیداز و آمینوپپتیداز نوع N قادر به تجزیه و تغییر گلوتن هستند (**جدول شماره ۴**).

مطالعه حاضر نشان داد که پروبیوتیک‌های بومی ایران از نظر فعالیت آنزیمی پرولیل‌اندوپپتیداز و آمینوپپتیداز نوع N دارای اختلاف فعالیت معناداری نسبت به نمونه تجاری (VSL#3) است (**تصویر شماره ۳**). یافته‌های حاصل از این تحقیق ضمن مشخص کردن اثر پروبیوتیک‌ها در تجزیه گلوتن می‌تواند مبنایی جهت مطالعات کاربردی در این زمینه باشد.

سویه‌های پروبیوتیک که در بررسی‌های ما به عنوان سویه‌های مؤثر در تجزیه گلوتن و درمان بالقوه بیماران سلیاک معرفی شدند علاوه بر نقش مذکور، در درمان سایر بیماری‌ها هم به طور مؤثری به کار برده شده‌اند. به عنوان نمونه *L. paracasei* بر روی سلول‌های سرطانی دهانه‌ی رحم (هلا) نقش ضدسرطانی دارد و این نقش ضدسرطانی خود را از طریق افزایش بیان ژن‌های آپوپتوتیک *caspase9*, *caspase8*, *caspase3*, *BAX*, *BAD* و کاهش بیان ژن *BCI-2* القا می‌کند [۲۹]. همچنین سویه فوق می‌تواند یک ابزار مناسب در درمان بیماری روده التهابی باشد [۳۰]. به علاوه این سویه می‌تواند در پیشگیری و درمان کبد چرب غیرالکلی مؤثر واقع شود [۳۱]. *L. plantarum* که سویه شناسایی‌شده دیگر بررسی‌های ما بود در درمان بیماری‌های کبدی الکلی مؤثر نشان داده شده است [۳۲]. همچنین سویه مذکور اثرات ضدآلایمر از خود نشان داده است [۳۳]. نشان داده شده که سویه *L. pentosus* در پیشگیری و درمان هایپرکلسترمیا ایفای نقش می‌کند [۳۴]. سویه دیگری که در بررسی‌های ما نقش اثربخشی در تجزیه گلوتن داشت *L. helveticus* بود که اثربخشی آن در درمان سایر بیماری‌ها نیز نشان داده شده است. از جمله در یک تحقیق نشان داده شده که سویه مذکور می‌تواند نقش پیشگیرانه در ابتلا به آرتریت روماتوئید داشته باشد [۳۵]. همچنین اثرات سودمند دیگری از جمله پیشگیری از عفونت‌های معده‌ای روده‌ای، افزایش محافظت در برابر عوامل پاتوژن و تعدیل پاسخ‌های ایمنی بیمار در سویه مذکور مشخص شده است [۳۶]. در نهایت سویه *L. fermentum* که اثرات مفیدی همچون کاهش کلسترول خون، نقش پیشگیرانه در عفونت‌های معده‌ای و تنفسی، پیشگیری از بیماری‌های کبدی الکلی و سرطان کلورکتال را دارد [۳۷].

نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر در محدوده اثربخشی این پروبیوتیک‌ها تنها از نظر دو آزمون بررسی شد و از نظر سایر بررسی‌ها به دلیل کمبود منابع مالی و امکانات دارای محدودیت است و نیاز است که کارایی آن‌ها از لحاظ فعالیت سایر آزمون‌های موردنیاز جهت تجزیه کامل گلوتن شامل ایمونوپیتیداز، تری‌پتیداز، پرولیداز، پرولیناز و دی‌پتیداز مورد بررسی قرار گیرد تا بتوان به ترکیبی از پروبیوتیک‌های بومی با کارایی بالا جهت تجزیه گلوتن دست یافت. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که پروبیوتیک‌های بومی ایران دارای فعالیت مؤثر پرولیل اندوپتیداز و آمینوپتیداز نوع N هستند که می‌توانند به عنوان گزینه‌های انتخابی جهت استفاده در ترکیبی جهت تجزیه گلوتن و کمک به بیماران سلیاک مورد استفاده قرار گیرند. یافته‌های این پژوهش می‌تواند به عنوان مبنایی در تحقیقات کاربردی مورد استفاده قرار گیرد.

غنی از پرولین انتخاب شدند. نتایج نشان داد که ترکیب این ۱۰ گونه لاکتوباسیل می‌تواند به عنوان یک فرمول پروبیوتیک بالقوه برای درمان بیماران سلیاک باشد [۲۲].

در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۵ انجام شد، به منظور افزایش باکتری‌های تجزیه‌کننده گلوتن در روده، خوک‌ها به مدت ۱۶ هفته با رژیم غنی از گلوتن تغذیه شدند. سپس باکتری‌های روده‌ای جداسازی و کشت داده شدند. ۴ گونه به طور مؤثری قادر به تجزیه گلوتن و کاهش ایمنی‌زایی آن بودند که شامل *Lact. amylovorus*, *Lact. johnsonii*, *Lact. Rumi-nis*, *Lact. salivarius* بودند [۲۳]. این مطالعه نشان داد که لاکتوباسیلوس‌ها باکتری‌های روده‌ای غالب تجزیه‌کننده گلوتن هستند که یافته‌های آن موافق با یافته‌های بررسی‌ای است که توسط کامینرو^۳ انجام شد و هردو مطالعه *Lact. Amylovorus*, *Lact. Ruminis* را به عنوان گونه‌های اصلی تجزیه‌کننده گلوتن شناسایی کردند [۲۴]. در یک مطالعه که روی مدل‌های موشی حساس به گلیادین انجام گرفته به نظر می‌رسد تجویز *Lacto-basillus casei* در کاهش علائم مؤثر واقع شده است [۲۵].

همسو با یافته‌های پژوهش ما تحقیقاتی انجام گرفته که اثربخشی سویه‌های مذکور را در تجزیه گلوتن و بهبود بیماری سلیاک نشان می‌دهد. در یک مطالعه در سال ۲۰۱۲ محققان *Lactobacillus fermentum* را به محیط کشت سلول‌های اپیتلیال روده اضافه کردند تا اثرات این پروبیوتیک را بر آسیب‌های ناشی از گلیادین بر سلول بررسی کنند. بررسی‌ها نشان داد اضافه کردن پروبیوتیک فوق به علت سم‌زدایی گلیادین و بهبود وضعیت سلول‌های روده می‌تواند در درمان بیماران سلیاک مفید واقع شود [۲۶].

در بررسی‌ای که در آن کودکان مبتلا به بیماری سلیاک با رژیم گلوتن تغذیه می‌شدند، نشان داده شد که تجویز روزانه خوراکی دو زیرگونه از *L. paracasei* و *L. planarum* سبب تسکین پاسخ‌های ایمنی در کودکان مبتلا به بیماری سلیاک می‌شود [۲۷].

در یک بررسی که در سال ۲۰۱۷ انجام گرفت ۱۸ گونه پروبیوتیک تجاری از لحاظ توانایی آنزیماتیک برای تجزیه گلوتن مورد ارزیابی قرار گرفتند. این بررسی نشان داد که گونه‌های لاکتوباسیل ارزیابی‌شده توانایی آنزیماتیک مختلفی در تجزیه اپیتوپ‌های غنی از پرولین دارند. *L. plantarum* (۲۷LP و ۳۵LP) بیشترین فعالیت آمینوپتیداز نوع N را داشت. و *L. paracasei* (GP12 و BGP2) و *L. planarum* (LP33) نیز دارای بیشترین فعالیت پرولیل اندوپتیداز بودند. در نتیجه به عنوان سویه‌های بالقوه در تجزیه گلوتن قابل انتخاب هستند [۲۸].

3. Caminero

ملاحظات اخلاقی

پیروی از اصول اخلاق پژوهش

این مقاله شامل هیچ گونه مطالعه‌ای بر روی نمونه‌های انسانی و حیوانانی نیست و در طول مسیر این مطالعه کلیه اصول اخلاق پژوهش در نظر گرفته شد.

حامی مالی

این مقاله با حمایت دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران انجام شده است.

مشارکت نویسندگان

طراحی پروژه: محمدعلی مظلومی؛ نگارش مقاله: الهام رستمی، رضا حیدری، مهدیه شیرزاد؛ طراحی جداول: الهام رستمی، رضا حیدری؛ کار آزمایشگاهی: الهام رستمی، رضا حیدری، مهدیه شیرزاد؛ بررسی متن مقاله: محمدعلی مظلومی، الهه متوسلی.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌کنند که هیچ تضاد منافی در این مقاله وجود ندارد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مراتب سپاس‌گزاری خود را از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی تهران بابت حمایت مالی از این مطالعه به عمل می‌آورند.

References

- [1] Caio G, Volta U, Sapone A, Leffler DA, De Giorgio R, Catassi C, et al. Celiac disease: A comprehensive current review. *BMC Med.* 2019; 17(1):142. [DOI:10.1186/s12916-019-1380-z] [PMID] [PMCID]
- [2] Singh P, Arora A, Strand TA, Leffler DA, Catassi C, Green PH, et al. Global prevalence of Celiac disease: Systematic review and meta-analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2018; 16(6):823-36. e2. [DOI:10.1016/j.cgh.2017.06.037] [PMID]
- [3] Losowsky MS. A history of Coeliac disease. *Dig Dis.* 2008; 26(2):112-20. [DOI:10.1159/000116768] [PMID]
- [4] Chander AM, Yadav H, Jain S, Bhadada SK, Dhawan DK. Cross-talk between gluten, intestinal microbiota and intestinal mucosa in Celiac disease: Recent advances and basis of autoimmunity. *Front Microbiol.* 2018; 9:2597. [DOI:10.3389/fmicb.2018.02597] [PMID] [PMCID]
- [5] Uhde M, Yu X, Bunin A, Brauner C, Lewis SK, Lebwohl B, et al. Phenotypic shift of small intestinal intra-epithelial type 1 innate lymphoid cells in Celiac disease is associated with enhanced cytotoxic potential. *Clin Exp Immunol.* 2020; 200(2):163-75. [DOI:10.1111/cei.13414] [PMID] [PMCID]
- [6] Fasano A. Clinical presentation of Celiac disease in the pediatric population. *Gastroenterology.* 2005; 128(4):S68-73. [DOI:10.1053/j.gastro.2005.02.015] [PMID]
- [7] Coqueiro A, Bonvini A, Tirapegui J, Rogero M. Probiotics supplementation as an alternative method for Celiac disease treatment. *Int J Probiotics Prebiotics.* 2016; 12(1):23-32. https://www.researchgate.net/publication/318351358_Probiotics_supplementation_as_an_alternative_method_for_celiac_disease_treatment
- [8] Bascunan KA, Vespa MC, Araya M. Celiac disease: Understanding the gluten-free diet. *Eur J Nutr.* 2017; 56(2):449-59. [DOI:10.1007/s00394-016-1238-5] [PMID]
- [9] de Sousa Moraes LF, Grzeskowiak LM, de Sales Teixeira TF, Gouveia Peluzio Mdo C. Intestinal microbiota and probiotics in Celiac disease. *Clin Microbiol Rev.* 2014; 27(3):482-9. [DOI:10.1128/CMR.00106-13] [PMID] [PMCID]
- [10] Bozzi Cionci N, Baffoni L, Gaggia F, Di Gioia DD. Therapeutic microbiology: The role of bifidobacterium breve as food supplement for the prevention/treatment of paediatric diseases. *Nutrients.* 2018; 10(11):1723. [DOI:10.3390/nu10111723] [PMID] [PMCID]
- [11] Vlasova AN, Kandasamy S, Chattha KS, Rajashekara G, Saif LJ. Comparison of probiotic lactobacilli and bifidobacteria effects, immune responses and rotavirus vaccines and infection in different host species. *Vet Immunol Immunopathol.* 2016; 172:72-84. [DOI:10.1016/j.vetimm.2016.01.003] [PMID] [PMCID]
- [12] Kailasapathy K. Microencapsulation of probiotic bacteria: Technology and potential applications. *Curr Issues Intest Microbiol.* 2002; 3(2):39-48. [PMID]
- [13] Chae CS, Kwon HK, Hwang JS, Kim JE, Im SH. Prophylactic effect of probiotics on the development of experimental autoimmune myasthenia gravis. *PLoS One.* 2012; 7(12):e52119. [DOI:10.1371/journal.pone.0052119] [PMID] [PMCID]
- [14] Dickerson FB, Stallings C, Origoni A, Katsafanas E, Savage CL, Schweinfurth LA, et al. Effect of probiotic supplementation on Schizophrenia symptoms and association with gastrointestinal functioning: A randomized, placebo-controlled trial. *Prim Care Companion CNS Disord.* 2014; 16(1):PCC. [DOI:10.4088/PCC.13m01579] [PMID] [PMCID]
- [15] Norouzbeigi S, Vahid-Dastjerdi L, Yekta R, Sohrabvandi S, Zendeboodi F, Mortazavian AM. Celiac therapy by administration of probiotics in food products: A review. *Curr Opin Food Sci.* 2020; 32:58-66. [DOI:10.1016/j.cofs.2020.01.005]
- [16] Giorgi A, Cerrone R, Capobianco D, Filardo S, Mancini P, Zanni F, et al. A probiotic preparation hydrolyzes gliadin and protects intestinal cells from the toxicity of pro-inflammatory peptides. *Nutrients.* 2020; 12(2):495. [DOI:10.3390/nu12020495] [PMID] [PMCID]
- [17] Kelly CP, Bai JC, Liu E, Leffler DA. Advances in diagnosis and management of Celiac disease. *Gastroenterology.* 2015; 148(6):1175-86. [DOI:10.1053/j.gastro.2015.01.044] [PMID] [PMCID]
- [18] Mohammadibakhsh R, Sohrabi R, Salemi M, Mirghaied MT, Behzadifar M. Celiac disease in Iran: A systematic review and meta-analysis. *Electron Physician.* 2017; 9(3):3883-95. [DOI:10.19082/3883] [PMID] [PMCID]
- [19] Green PHR, Cellier C. Celiac disease. *N Engl J Med.* 2007; 357(17):1731-43. [DOI:10.1056/NEJMra071600] [PMID]
- [20] Shirzad M, Hamed J, Motevaseli E, Modarressi MH. Anti-elastase and anti-collagenase potential of Lactobacilli exopolysaccharides on human fibroblast. *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* 2018; 46(sup1):1051-61. [DOI:10.1080/21691401.2018.1443274] [PMID]
- [21] Zhang Z, Lv J, Pan L, Zhang Y. Roles and applications of probiotic Lactobacillus strains. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2018; 102(19):8135-43. [DOI:10.1007/s00253-018-9217-9] [PMID]
- [22] Francavilla R, De Angelis M, Rizzello CG, Cavallo N, Dal Bello F, Gobetti M. Selected probiotic lactobacilli have the capacity to hydrolyze gluten peptides during simulated gastrointestinal digestion. *Appl Environ Microbiol.* 2017; 83(14):e00376-17. [DOI:10.1128/AEM.00376-17] [PMID] [PMCID]
- [23] Duar RM, Clark KJ, Patil PB, Hernández C, Brünig S, Burkey TE, et al. Identification and characterization of intestinal lactobacilli strains capable of degrading immunotoxic peptides present in gluten. *J Appl Microbiol.* 2015; 118(2):515-27. [DOI:10.1111/jam.12687] [PMID]
- [24] Caminero A, Herrán AR, Nistal E, Pérez-Andrés J, Vaquero L, Vivas S, et al. Diversity of the cultivable human gut microbiome involved in gluten metabolism: Isolation of microorganisms with potential interest for coeliac disease. *FEMS Microbiol Ecol.* 2014; 88(2):309-19. [DOI:10.1111/1574-6941.12295] [PMID]
- [25] Marasco G, Di Biase AR, Schiumerini R, Eusebi LH, Iughetti L, Ravaioli F, et al. Gut microbiota and Celiac disease. *Dig Dis Sci.* 2016; 61(6):1461-72. [DOI:10.1007/s10620-015-4020-2] [PMID]
- [26] Bakshi A, Stephen S, Borum ML, Doman DB. Emerging therapeutic options for Celiac disease: Potential alternatives to a gluten-free diet. *Gastroenterol Hepatol (N Y).* 2012; 8(9):582-8. [PMID] [PMCID]

- [27] Håkansson Å, Andrén Aronsson C, Brundin C, Oscarsson E, Molin G, Agardh D. Effects of *Lactobacillus Plantarum* and *Lactobacillus Paracasei* on the peripheral immune response in children with Celiac disease autoimmunity: A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Nutrients*. 2019; 11(8):1925. [DOI:10.3390/nu11081925] [PMID] [PMCID]
- [28] Francavilla R, De Angelis M, Rizzello CG, Cavallo N, Dal Bello F, Gobetti M. Selected probiotic lactobacilli have the capacity to hydrolyze gluten peptides during simulated gastrointestinal digestion. *Appl Environ Microbiol*. 2017; 83(14):e00376-17. [DOI:10.1128/AEM.00376-17] [PMID] [PMCID]
- [29] Riaz Rajoka MS, Zhao H, Lu Y, Lian Z, Li N, Hussain N, et al. Anticancer potential against cervix cancer (HeLa) cell line of probiotic *Lactobacillus Casei* and *Lactobacillus Paracasei* strains isolated from human breast milk. *Food Funct*. 2018; 9(5):2705-15. [DOI:10.1039/C8FO00547H] [PMID]
- [30] Kim WK, Jang YJ, Seo B, Han DH, Park S, Ko GP. Administration of *Lactobacillus paracasei* strains improves immunomodulation and changes the composition of gut microbiota leading to improvement of colitis in mice. *J Funct Foods*. 2019; 52:565-75. [DOI:10.1016/j.jff.2018.11.035]
- [31] Yao F, Jia R, Huang H, Yu Y, Mei L, Bai L, et al. Effect of *Lactobacillus paracasei* N1115 and fructooligosaccharides in nonalcoholic fatty liver disease. *Arch Med Sci*. 2019; 15(5):1336-44. [DOI:10.5114/aoms.2019.86611] [PMID] [PMCID]
- [32] Barone R, Rappa F, Macaluso F, Caruso Bavisotto C, Sangiorgi C, Di Paola G, et al. Alcoholic liver disease: A mouse model reveals protection by *Lactobacillus fermentum*. *Clin Transl Gastroenterol*. 2016; 7(1):e138. [DOI:10.1038/ctg.2015.66] [PMID] [PMCID]
- [33] Nimgampalle M, Kuna Y. Anti-Alzheimer properties of probiotic, *Lactobacillus plantarum* MTCC 1325 in Alzheimer's disease induced Albino Rats. *J Clin Diagn Res*. 2017; 11(8):KC01-5. [DOI:10.7860/JCDR/2017/26106.10428] [PMID] [PMCID]
- [34] Bendali F, Kerdouche K, Hamma-Faradji S, Drider D. In vitro and in vivo cholesterol lowering ability of *Lactobacillus pentosus* KF923750. *Benef Microbes*. 2017; 8(2):271-80. [DOI:10.3920/BM2016.0121] [PMID]
- [35] Yamashita M, Matsumoto K, Endo T, Ukibe K, Hosoya T, Matsumura Y, et al. Preventive effect of *Lactobacillus helveticus* SBT2171 on collagen-induced Arthritis in mice. *Front Microbiol*. 2017; 8:1159. [DOI:10.3389/fmicb.2017.01159] [PMID] [PMCID]
- [36] Taverniti V, Guglielmetti S. Health-promoting properties of *Lactobacillus helveticus*. *Front Microbiol*. 2012; 3:392. [DOI:10.3389/fmicb.2012.00392] [PMID] [PMCID]
- [37] Naghmouchi K, Belguesmia Y, Bendali F, Spano G, Seal BS, Drider D. *Lactobacillus fermentum*: A bacterial species with potential for food preservation and biomedical applications. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2020; 60(20):3387-99. [DOI:10.1080/10408398.2019.1688250] [PMID]

This Page Intentionally Left Blank